

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Philipps-Universität zu Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Bestimmung der Blutmenge in Blutflecken mittels einer Benzidinmethode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Rudolf von Hansen
aus Schloss Holzhammer/Schnaittenbach

Marburg 1967

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Philipps-Universität zu Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Bestimmung der Blutmenge in Blutflecken mittels einer Benzidinmethode



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Rudolf von Hansen
aus Schloss Holzhammer/Schnaittenbach

Marburg 1967



Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Marburg am 1.12.1967

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert

Referent: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Korreferent: Doz. Dr. med. C. Sekeris

Meinem Vater in Dankbarkeit gewidmet

Inhalt

A. <u>Einleitung</u>	7
Bisher veröffentlichte Methoden zur Blutmengen- bestimmung	7
I. Spezielle gerichtlich-medizinische Methoden	
für Bestimmungen an Blutflecken	7
1. Bestimmung der Trockensubstanz	7
2. Wägung des getrockneten Stoffes	8
3. Bestimmung des Hb.-Gehaltes im Extrakt	8
4. Bestimmung der Dichte des Extraktes	9
5. Überführung des Hb. im Extrakt in Hämatin . .	9
6. Bestimmung durch quantitative Vergleichs- präzipitation	10
7. Bestimmung des Rest-N-Gehaltes im Extrakt .	11
8. Kolorimetrische Methode	11
II. Methoden der operativen Fächer zur Messung	
des Blutverlustes	13
1. Gravimetrie	13
a) Gewicht des Patienten	13
b) Gewichtsbestimmung von Tupfern und Tüchern	13
2. Hämatokritmessung	13
3. Erythrozytenzählung (Cr ⁵¹)	14

4. Erythrozytenvolumen-Methode (T 1824)	14
5. Kolorimetrische Bestimmung mit dem "Perdo- meter"	14
6. Bestimmung der Leitfähigkeitsänderung mit dem "Hämaporrhometer"	14
B. <u>Eigene Versuche</u>	16
I. Allgemeines	16
II. Versuche an Hand der Literatur	17
1. Bestimmung der Trockensubstanz	17
2. Wägung des getrockneten Stoffes	17
III. Versuche zur Blutmengenbestimmung an Blut- flecken in Textilien	19
1. Grundlagen	19
2. Reagentien und Methoden	29
3. Vorversuche	30
4. Hauptversuche	38
a) Versuche mit Rinderblut	38
b) Versuche mit Menschenblut	45
IV. Schlussbesprechung	59
C. <u>Zusammenfassung</u>	62
D. <u>Literatur</u>	63

A. Einleitung

Bisher veröffentlichte Methoden zur Blutmengen- bestimmung

Im Jahre 1899 haben STRASSMANN und ZIEMKE erstmals versucht, eine vergossene Blutmenge zu bestimmen. Seitdem sind mehrere, im Prinzip unterschiedliche, Verfahrensweisen angegeben worden. Hinzu kamen in neuerer Zeit die Methoden zur Feststellung des Blutverlustes bei grossen Operationen.

I. Spezielle gerichtlich-medizinische Methoden für Bestimmungen an Blutflecken

1. Bestimmung der Trockensubstanz

Durch vergleichendes Wiegen gleichgrosser Stücke blutbefleckten und sauberen Stoffes nach Trocknung bis zur Gewichtskonstanz, kann aus der Gewichts Differenz auf die vergossene Blutmenge geschlossen werden. Hierbei wird das Verhältnis

Trockensubstanz : flüssiges Blut = 1 : 5
gesetzt und auf die gesamte Fleckenfläche bezogen. Der Fehlerbereich dieser Methode wird von STRASSMANN und ZIEMKE mit 20% angegeben.

2. Wägung des getrockneten Stoffes

Der blutbefleckte Stoff wird vor und nach der Extraktion des Blutes bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Die Extraktion kann bei frischen Flecken mit Wasser, bei älteren mit kaltgesättigter Boraxlösung und Nachwaschen mit Wasser geschehen. Die im Gesamtflecken enthaltene Blutmenge lässt sich wie unter 1 leicht berechnen. STRASSMANN und ZIEMKE geben die Fehlerbreite mit 20% an.

3. Bestimmung des Hb.-Gehaltes im Extrakt

Im Extrakt eines Flecken- oder Erdbodenaliquote wird der Hämoglobingehalt bestimmt. Vom gefundenen Wert aus rechnet man unter Berücksichtigung des Gesamtfleckens oder Erdevolumens auf Vollblut um, indem man bei diesem einen durchschnittlichen Hb.-Gehalt annimmt. STRASSMANN und ZIEMKE massen das Hb. im Extrakt mit dem Gowers'schen Hämoglobinometer. LEERS benutzte das Sahli'sche Hämomometer. SCHULZ machte entsprechende Versuche an Sand, Gartenerde und Sägespänen. LEERS fand, dass sich zur Extraktion kaltgesättigte Boraxlösung besonders eignet. Anorganische Beimengungen beseitigte er vor der Hämetrie durch Abzentrifugieren. An 3-4 Wochen alten Blutspuren konnte er auf diese Weise noch fast die ganze Blutmenge finden. Bei Erhitzen auf 120° sank die Ausbeute jedoch auf die Hälfte

herab. STRASSMANN-ZIEMKE und SCHULZ konnten an höchstens 8 Tage alten Spuren bei Extraktion mit Wasser etwa 85% der Blutmenge zurückgewinnen. Die Ausbeute mehrere Monate alter Proben bei Extraktion mit Boraxlösung betrug etwa 70%.

4. Bestimmung der Dichte des Extraktes

Dieses von MARX angegebene Verfahren wird durch so viele Fehlermöglichkeiten beeinflusst, dass es sich für eine exakte Blutmengenbestimmung nicht eignet.

5. Überführung des Hb. im Extrakt in Hämatin

Dieses von BROZEIT angegebene Verfahren beruht darauf, dass eine angesäuerte Blutlösung beim Ausschütteln mit Äther das Hämatin an den Äther abgibt. Erneutes Ausschütteln des Äthers mit Ammoniakwasser lässt allein den Blutfarbstoff übertreten, ohne dass weitere ebenfalls im Äther gelöste Stoffe wie Fette miterfasst werden. Nach Eindampfen kann das alkalische Hämatin gewogen werden. SCHULZ gab das Verhältnis

Vollblut : Hämatin = 100 : 0,66

an. Dieses Verfahren ist sehr umständlich und hat nach SCHULZ und KRAFT in Sand- und Erdproben bei einem Blutalter von 1-30 Tagen einen durchschnittlichen Ausbeutefehler von - 16%.

6. Bestimmung durch quantitative
Vergleichspräzipitation

Das Verfahren ist von SCHULZ angegeben worden. Im Vorversuch wird zu einer jeweils gleichen Menge einer geometrischen Verdünnungsreihe von Vollblut eine gleichbleibende Menge Antiserum gegeben. Nach 30 Minuten liest man ab, welche Verdünnungsstufe noch präzipitiert ist. Der Blutfleckenextrakt und das Antiserum werden zum Ausgleich des Eiweissverlustes im Extrakt klar filtriert. Auch vom Extrakt wird dann eine geometrische Verdünnung hergestellt, weiterhin wird wie im Vorversuch gearbeitet. Nach der Formel

$$\frac{n \cdot k}{w} = x$$

wird die gesuchte Blutmenge x errechnet.

n = letzte präzipitierte Verdünnungsstufe des Extraktes,

k = zugesetzte Flüssigkeitsmenge für die Extraktion,

w = letzte präzipitierte Verdünnungsstufe im Vorversuch.

Beimengungen von Körpereiwiss aus Schweiss und anderen Ausscheidungen, Eiweissverlust durch Fäulnis, Erhitzen oder durch Chemikalien können das Ergebnis entscheidend beeinflussen. In Sand und Gartenerde wies SCHULZ trotzdem noch nach bis zu 10 Tagen die ganze Blutmenge nach, an Leinwand noch nach 8 Monaten. Die Ergebnisse von WEEDE waren allerdings viel schlechter und ergaben zum Teil sehr hohe Defizite.

7. Bestimmung des Rest-N-Gehaltes im Extrakt

MITA bestimmte mit der Methode von Kjeldahl den Reststickstoffgehalt im Blutspurenextrakt und rechnete nach der Formel

$$\frac{a}{100} = \frac{b}{x}$$

die gesuchte Blutmenge x aus.

a = N-Gehalt der Norm

b = N-Gehalt im Extrakt

Während MITA selbst 100% Ausbeute behauptete, und KRAFT in Erdproben ein durchschnittliches Defizit von 30% bei einem Blutalter bis zu 4 Wochen angibt, hat WEEDE die Unbrauchbarkeit der Methodik nachgewiesen.

Wenn man die Blutmenge aus dem Hb.- oder N-Gehalt des Extraktes berechnen will, muss man nach BERG einen oft erheblichen Verlust durch kolloidale Absorption einberechnen. Seine Ausbeute lag im Sande bei fast 100%, in kiesigen Quarz-Feldspatböden bei 73%, in Nadelwaldboden bei 49% und in lehmreicher Gartenerde bei 15%.

8. Kolorimetrische Methode

SCHMIDT zerkleinerte gleichgrosse Stücke eines Blutfleckens und eines Kontrollstoffes. In gleichen Mengen 20% KOH, der zur besseren Löslichkeit möglicherweise vor-

handenen Hämätins etwas KCN zugesetzt ist, wird das Material 72 Stunden lang ausgelaugt. Der gewonnene Extrakt wird in einem Absorptionsmaximum photometrisch gemessen. Als Vergleichslösung dient ein Gemisch aus

2 ml Vollblut + 50 ml KOH + 1 Messerspitze KCN, wobei auch bei der Extraktion gleiche Reagensmengen genommen werden müssen. Nach der Formel

$$\frac{\text{Extrakt}}{\text{Vergleichslösung}} = \frac{x}{2\text{ml}}$$

kann das gesuchte Blutvolumen x der Fleckenprobe berechnet werden. Nach Planimetrieren des Blutfleckens kann aus dem Verhältnis Fleckenprobe : Gesamtfleck die tatsächliche Blutmenge bestimmt werden. Ohne Einzelzahlen anzugeben empfiehlt SCHMIDT, zum Ergebnis 25% zuzuzählen, was dem nicht mehr auslaugbaren Blutrest im Stoff entspreche. Als Fehlerquellen gibt er die Löslichkeit von Farbstoffen in Geweben an, wie auch Teilauflösung von Wolle und Seide durch die KOH.

II. Methoden der operativen Fächer zur Messung des Blutverlustes

Literaturangaben finden sich bei HAUASLI.

1. Gravimetrie

a) Gewicht des Patienten

Hierbei wird der Patient vor und nach der Operation gewogen, wobei entferntes Gewebe berücksichtigt werden muss. Unkontrollierbare Flüssigkeitsverluste, z.B. durch Schwitzen, verfälschen diese sehr ungenaue Methode.

b) Gewichtsbestimmung von Tupfern und Tüchern

Tupfer, Bauchtücher usw. werden vor und nach der Operation gewogen, wobei die zum Anfeuchten benutzte Kochsalzlösung berücksichtigt werden muss. Hauptfehlerquelle ist der Gewichtsverlust durch Verdunstung.

2. Hämatokritmessung

Wenn man vor und nach dem Eingriff den Hämatokritwert bestimmt, kann man aus seinem Absinken auf die Höhe des Blutverlustes schliessen.

Als ganz spezielle Methoden seien hier nur erwähnt:

3. Erythrozytenzählung (Cr^{51}) und

4. Erythrozytenvolumen-Methode (T 1824)

Genaue Angaben mögen der Literatur entnommen werden.

5. Kolorimetrische Bestimmung mit dem "Perdometer"

Der Apparat besteht aus einer gewöhnlichen Waschmaschine, der ein Photometer mit Durchflussküvette angeschlossen ist. Alle bluthaltigen Materialien werden, wie sie bei der Operation anfallen, in die Waschmaschine gegeben, die mit Wasser und einem Hämolytator gefüllt ist. Das hämolysierte Blut wird automatisch durch die Küvette gepumpt. Die Schwächung des Lichtstrahls ist dem Gehalt an ausgewaschenem Blut proportional. Das Photometer zeigt, abzüglich eines vorher gemessenen Leerwertes, laufend den Blutverlust in Form steigender Extinktionswerte an. Die Skala kann auch direkt auf Vollblut geeicht werden. Die Messwerte werden durch absorbierende Stoffe wie Fett und Baumwollflöckchen beeinträchtigt.

6. Bestimmung der Leitfähigkeitsänderung¹⁾

mit dem "Hämaporrhometer"

Das "Hämaporrhometer" besteht im Prinzip aus einer Waschmaschine, der eine Apparatur zum Messen der Leitfähigkeit

der Waschflüssigkeit beigeschaltet ist. Das Gerät wird mit Leitungswasser beschickt. Mit steigendem Blut- und Elektrolytgehalt sinkt der elektrische Widerstand des Wassers. Der Leitfähigkeitsmesser arbeitet nach dem Prinzip der Wheatstonschen Brücke. Dabei besteht der eine Brückenweig aus einer Wassermenge (Leitungswasser), deren Leitfähigkeit durch das ausgewaschene Blut verändert wird. Gegenüber dem "Perdometer" muss bei dieser Methode die Kochsalzmenge der Tupfer berücksichtigt werden, da sie selbst Blut vortäuscht. Eine doppelte Kochsalzmenge ergibt eine mehr als doppelt so hohe Blutanzeige. Weitere wichtige elektrolythaltige Flüssigkeiten, die in das Gerät angesaugt werden können und das Ergebnis verfälschen, sind Galle, Urin, Magensaft und Aszites. Gegenüber dem "Perdometer" zeigt das "Hämaporrhometer" etwa 20% mehr Blutverlust an.

1) Nach Kraft, D. und J. Richter: Blutverlustmessung bei grossen Operationen. Dtsch. Gesundh.- Wes. 18, 960, 1963

B. Eigene Versuche

I. Allgemeines

Für die Versuche wurde Rinder- und Menschenblut verwendet, das in Na-Zitrat aufgefangen wurde. Die Zitratmenge betrug jeweils 1%. Das Rinderblut wurde nach Tötung des Tieres und Kehlschnitt im Schlachthof aufgefangen, beim Menschenblut handelte es sich um venöses Zitratblut.

Zur Flächenbestimmung der Blutflecken und deren in die Versuche eingehenden Teile wurden deren beider Konturen über einem Lichtkasten auf Schreibmaschinenpapier übertragen. Das Papier wurde ausgeschnitten, 2 Stunden im Exsikkator getrocknet und dann gewogen. Aus dem Verhältnis des so gewonnenen Gewichtes zu dem von 100 cm^2 Papier (nach gleicher Behandlung), konnte die Größe der Flecken und deren Teile errechnet werden. Die Blutmenge der einzelnen Fleckenproben ergab sich aus der Teilgröße in Bezug zum Gesamtflecken. Der Mittelwert des Gewichtes von 100 cm^2 Papier betrug 0,68014 g. Zur Erläuterung wird ein Beispiel aus der Tabelle I gegeben: Ein Blutfleck, auf Papier übertragen, hat ein Fleckengewicht von 1,17 g. Aus dem Verhältnis von

$$0,68 : 100 = 1,17 : x$$

errechnet sich die Fleckengröße mit $171,5 \text{ cm}^2$.

II. Versuche an Hand der Literatur

1. Bestimmung der Trockensubstanz

Auf weissem, sauberen Kittelstoff werden mehrere Flecken mit je 5 ml zitriertem Rindervollblut hergestellt. Nach 3 Tagen wurde die Grösse der völlig trockenen Flecken und ihrer in die Versuche eingehenden Teile bestimmt. Ausserdem wurden den blutbefleckten Proben entsprechende, saubere Vergleichsstücke ausgeschnitten. Die befleckten und sauberen Proben kamen für mehrere Stunden bei 80-90° in den Trockenschrank, dann für 2 Stunden zum Abkühlen in den Exsikkator und wurden dann gewogen. Aus der Gewichts Differenz zwischen den Trockengewichten und unter Bezug auf die Gesamtflecken grösse und das Verhältnis

Trockengewicht : Vollblut = 1 : 5 (s.o.)

wurde die Blutmenge berechnet. Die Ausbeute lag bei den 4 Proben zwischen 75 und 89%. Der Ausbeuteverlust lag also, wie auch in der Literatur angegeben, etwa zwischen 10 und 20% (Tabelle I).

2. Wägung des getrockneten Stoffes

Auf weissem, sauberen Kittelstoff wurden 2 Flecken mit je 5 ml zitriertem Rindervollblut hergestellt. Nach 3 Tagen wurden die Proben in ihrer Grösse bestimmt, bis zur Gewichts-

Tabelle I. 4 Versuche mit 3 Tage alten Blutflecken von je 5 ml Zitratvollblut auf Leinenstoff. Nachweis der Blutmenge im Flecken durch Bestimmung der Trockensubstanzmenge. Bei Fleck 1 und 2 wurde ein Aliquot, bei Fleck 3 und 4 der ganze Fleck als Probe genommen. 100 cm² Vergleichspapier wogen 0,68014 g.

Proben-Nummer	1	2	3	4
Zitratblut (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0
Fleckengewicht in Papier (g)	1,17	1,13	1,21	1,13
Resultierende Fleckengrösse (cm ²)	171,56	166,77	177,64	166,11
Gewicht der Proben (g)	0,75	0,53	---	---
Probengrösse (cm ²)	110,43	77,93	---	---
Multiplikator	1,55	2,14	---	---
Trockengewicht der Fleckenprobe (g)	2,50	1,82	4,01	3,78
Trockengewicht der sauberen Probe (g)	2,01	1,40	3,15	2,98
Trockengewichtsdifferenz der Proben (g)	0,49	0,41	---	---
Trockengewichtsdifferenz für den ganzen Fleck (g)	0,75	0,89	0,86	0,81
Gefundene Blutmenge (ml)	3,77	4,43	4,30	4,04
Ausbeute (%)	75,4	88,5	86,0	80,8
Fehler (%)	24,6	11,5	14,0	19,2

konstanz im Trockenschrank bei 80-90° getrocknet, im Exsikator 2 Stunden abkühlen gelassen und gewogen. Anschliessend kamen die Proben zur Extraktion des Blutes für 24 Stunden in kaltgesättigte Boraxlösung. Während dieser Zeit wurden sie mehrmals mit einem Glasstab gestampft. Zum Schluss wurde der Stoff mit Aqua dest. ausgespült und wie vorher getrocknet und gewogen. Aus der Gewichts Differenz liess sich, wie oben angeführt, die ausgewaschene Blutmenge errechnen (Tabelle II). Die Flecken hatten sich beim Trocknen derart verändert, dass das Blut nur noch ganz schlecht zu extrahieren war. Daher war die Ausbeute bei beiden Proben so gering. Für diese Methode wäre daher eine Trocknung im Vakuumexsikator bis zur Gewichtskonstanz zu erwägen.

III. Versuche zur Blutmengenbestimmung an Blutflecken in Textilien

Es wurde versucht, die Blutmenge aus wässerigen Fleckenextrakten mit Hilfe einer photometrisch gemessenen Benzidin-Farbreaktion zu bestimmen.

1. Grundlagen

Benzidin ist Diphenyldiamin. Die blaue Farbe entsteht als Zwischenstufe der Reaktion dadurch, dass jedes Molekül des

Tabelle II. 2 Versuche mit 3 Tage alten Blutflecken von je 5 ml Zitratvollblut auf Leinenstoff. Nachweis der Blutmenge im Flecken durch Bestimmung der Trockengewichtsdifferenz vor und nach Extraktion des befleckten Stoffes mit kaltgesättigter Boraxlösung.

Proben-Nummer	1	2
Zitratblut (ml)	5,0	5,0
Fleckengewicht in Papier (g)	1,21	1,18
Resultierende Fleckengrösse (cm ²)	178,47	173, 62
Gewicht der Probe in Papier (g)	0,73	0,73
Multiplikator	1,66	1,62
Trockengewicht der Probe (g)	2,29	1,75
Gewicht nach Extraktion (g)	2,13	1,57
Trockengewichtsdifferenz der Proben (g)	0,16	0,18
Trockengewichtsdifferenz für den ganzen Fleck (g)	0,26	0,29
Gefundene Blutmenge (ml)	1,30	1,46
Ausbeute (%)	26,1	29,2
Fehler (%)	73,9	70,8

Oxidationsproduktes (Diphenochinondiimin) sich mit einem noch unoxidierten Benzidinmolekül zu einem sogenannten mero-

chinoiden, blauen Komplex verbindet. Erst wenn kein freies Molekül mehr übrig ist, werden auch die komplex gebundenen Moleküle oxidiert, und die blaue geht in die braune Farbe des endgültigen Oxidationsproduktes über. Letztlich beruht diese Methode auf der Fähigkeit des Hb., die Oxidation von Benzidin mit H_2O_2 zu Benzidinblau zu katalysieren. Da die Oxidationsgeschwindigkeit über die blaue Zwischenform hinweg zu braun bei gegebener Hb.-Menge im wesentlichen von der H_2O_2 -Konzentration abhängt, soll man bei nicht zu hoher Peroxidmenge arbeiten. Die Reaktion wurde von WU erstmals quantitativ ausgewertet und zum Messen von Hb.-Konzentrationen herangezogen.

BING und BAKER arbeiteten später mit der von WU angegebenen Methode, um kleinste Hb.-Konzentrationen zu bestimmen. Da sie keine sicheren Ergebnisse erbracht hat, änderten sie die Methode etwas ab: bei einem Volumen des Einzelansatzes von 25 ml nahmen sie neben der wechselnden Blutcharge 2 ml 2% Benzidinlösung und 1 ml 0,6% H_2O_2 . Dieses Gemisch wurde 1 h stehen gelassen und verfärbte sich in dieser Zeit über Blau zu Purpur. Dann füllten sie mit 20% Eisessig zum Gesamtvolumen auf und bestimmten die Farbtiefe. Die Benzidinlösung stellten sie so her, dass sie 2 g Benzidin in 20 ml Eisessig unter leichtem Erwärmen lösten, abkühlen liessen und dann auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllten. Anschliessend wurde das Reagens mit 0,5-1 g Kohle geschüttelt, filtriert und in brauner Flasche aufbewahrt. Da die Farbtiefe etwa proportional

der Menge und Konzentration an Benzidinreagens war, legten sie besonderen Wert auf die Qualität des Benzidins und auf genaues Abmessen der Lösung. Die 0,6% H_2O_2 -Lösung soll dagegen zwischen 0,5 und 0,75% variieren dürfen. Weiterhin betonen sie, dass das Peroxid nicht zum Blut selbst, sondern nur zur Mischung von Blut und Benzidin gegeben werden soll, da sonst die Farbausbeute zu gering sei. BACH und KULTJUGIN beschreiben ebenfalls, dass der Blutfarbstoff sowohl im Blut, wie in reinem Zustand bei Einwirkung von H_2O_2 sein peroxidatisches Vermögen fast völlig einbüsse. BING und BAKER geben weiter an, dass das Volumen des Reaktionsgemisches immer gleich sein solle, damit - bei immer gleichbleibenden Mengen von Benzidin und H_2O_2 - das Hb. die einzige Variable sei. Geringerprozentige Peroxidchargen ergaben zwar eine grössere Genauigkeit, erforderten jedoch auch eine längere Reaktionszeit. Im Bereich von $20-40^\circ$ soll die Temperatur Reaktionsgeschwindigkeit und Farbtiefe nicht beeinflussen. Die Fehlerbreite geben die Autoren mit $\pm 4\%$ an.

McFARLANE und McKENZIE-HAMILTON haben bei ihren Bestimmungen kleinster Hämoglobinemengen festgestellt, dass bei einer Reaktionszeit von 60 Minuten plus 15 Minuten nach dem Auffüllen bei Gebrauch einer 1,5-2% H_2O_2 -Lösung die Farbintensität am grössten und stabilsten war. 0,75% H_2O_2 ergab nur etwa 76% der Farbintensität, die vergleichsweise mit

1,5% H_2O_2 -Lösung auftrat. Höherprozentige H_2O_2 -Chargen erzeugten zwar eine höhere Farbintensität, diese war jedoch weniger stabil. Von Licht und Dunkelheit war die Reaktion unabhängig.

CREDITOR beschrieb eine weitere abgewandelte Benzidinreaktion. Für einen 100 ml-Ansatz nahm er 2 ml 2% Benzidinlösung, die er zur jeweiligen Blutlösung gab und gut mischte. Dann pipettierte er 1 ml 1,5% H_2O_2 hinzu und liess bei Raumtemperatur 1 Stunde stehen. Es entwickelte sich eine stabile purpurne Farbe. Hierauf wurde mit 20% Essigsäure auf 100 ml aufgefüllt, gemischt, und nach weiteren 30 Minuten bei 490 nm in einem photoelektrischen Kolorimeter die optische Dichte gemessen. Bei jeder Messreihe wurde eine Standard-Hämoglobinkurve mitbestimmt. Hervorgehoben wird die Reinigung des Benzidinpulvers und die gegenüber BING und BAKER höhere Endverdünnung der Ansätze auf 100 statt 25 ml. Hierdurch werde die Extinktion des Reagentienleerwertes verringert. Bei Verwendung von 1,5% H_2O_2 fand CREDITOR die Farbe bis zu 24 Stunden stabil. Im Bereich von 1-10 mg Hb./100 ml folgte die Eichkurve dem Beer'schen Gesetz; ihre Steigung änderte sich jedoch mit jeder frischbereiteten Benzidinlösung leicht. Weiterhin beobachtete CREDITOR, dass die Anwesenheit von Plasma die Benzidinreaktion insofern beeinträchtigte, als höhere Plasmawerte eine geringere Ausbeute bewirkten. Bei Plasmaverdünnungen zwischen 1:2 bis 1:25 fand er Ausbeuten

von 40-70%. Die besten Werte lagen bei der 1:100 Verdünnung, wo bis zu 90% des Hb. und darüber nachzuweisen waren. Die Verdünnung 1:200 brachte dann aber etwas niedrigere Werte zwischen 80 und 90%. Die Beeinträchtigung der Benzidinreaktion durch die Anwesenheit von Plasma liess sich nicht durch Erhitzen auf 56° für 1 Stunde verringern. Trotz diesen stark abweichenden Ausbeuten konnte er bei Doppelproben mit jeweils gleicher Plasmaverdünnung, jedoch verschiedenem Hb., eine Abweichung der Einzelwerte von höchstens 6,6%, im Mittel von 3,2% beobachten.

CROSBY und FURTH halten die von WU als Mikromethode angegebene Benzidinreaktion trotz den vielen später vorgenommenen Abänderungen für eine nicht ausreichend genaue Methode, um den Hb.-Gehalt im Plasma oder Urin zu messen. Als Hauptursache für eine Beeinträchtigung der Farbentwicklung nehmen sie ein Lipoprotein im Plasma als wahrscheinlich an, dass jedoch mit einem Gemisch aus Methanol und Chloroform ausgewaschen werden könne. Der von HAM dem Reaktionsgemisch beigefügte Alkohol verbesserte zwar die Ausbeute, machte sie jedoch nicht vollständig. Im übrigen schwankte diese jeweils entsprechend der Plasmamenge, was sich besonders dann ungünstig auswirken könne, wenn eine in ihrer Blutmenge unbekannte Probe in die Reaktion eingeht. Andererseits bewirkt der Alkohol ein Dunkelwerden des Benzidinreagens, so dass

dieses entweder jedes Mal frisch angesetzt, oder der Alkohol nach dem Mischen von Blut und Benzidin direkt zugegeben werden muss. CROSBY und FURTH gaben nach dem Mischen des Blutes mit 2 ml 2% Benzidinhydrochloridlösung 1 ml 95% Alkohol zu, weiter 1 ml 0,5% H_2O_2 und füllten mit 20% Essigsäure auf. Bei höheren Alkoholzugaben fanden sie auch Ausbeuten von über 100%, was für einen unspezifischen Effekt spricht. Bei Beachtung dieser Besonderheiten geben sie für Mikrobestimmungen eine Ausbeute von 95% einer bekannten, zum Plasma gegebenen Hb.-Menge an.

SCHLEYER und SELLIER haben ihrer Serumhämoglobin-Bestimmung im Leichenblut das Verfahren nach CREDITOR zugrundegelegt. Für die Streuung der an Hb.-Standardlösungen gewonnenen Ergebnisse geben sie neben der unvermeidlichen analytischen Fehlerbreite kleinste Veränderungen alternder Hb.-Lösungen an. Dem Serum schreiben auch sie ein "Auslöschphänomen" zu, das die quantitative Nachweisbarkeit von Hämoglobin um durchschnittlich etwa 30% herabsetzen soll. Für Hb.-Konzentrationen unter 6 mg/100 ml halten sie die Methodik für nicht mehr exakt. Eine besondere Reinigung des Benzidins haben sie nicht vorgenommen.

HANKS und Mitarbeiter geben bezüglich ihrer Benzidinlösung an, dass diese unverzüglich - d.h. innerhalb von 10 Minuten - benutzt werden müsse, wenn sie für Messungen an Hb.-Standard-

lösungen verwendet werden soll. Bei Proben, die Plasma enthalten, kann sie in den ersten 6 Stunden nach ihrer Herstellung genommen werden. HANKS gab zu 0,4 ml Plasma oder anderem hämoglobinhaltigen Material 6 ml 0,7% Benzidinlösung und 0,2 ml 3% H_2O_2 . Nach 3,5 Minuten wurde das Reaktionsgemisch bei 700 nm in einem Coleman-Junior-Spektrophotometer gegen einen Blindwert abgelesen. Die Besonderheit dieser Arbeitsweise liegt in der kurzen Reaktionszeit. Gemessen wird nicht der nach einiger Zeit entstehende purpurne Farbton, vielmehr im Gipfel eines gleich im Beginn auftretenden grünen Farbtones. Steigender NaCl-Gehalt in den Hb.-Standardansätzen hatte einen Abfall des Gipfels der grünen Farbe zur Folge. Gerinnungshemmende Stoffe hatten unterschiedlichen Einfluss auf die Benzidinreaktion. Während Heparin und Na-Zitrat die Reaktion nicht beeinflussten, trat bei Verwendung von Ammonium- und Kaliumoxalat eine Hemmung auf, so dass nur 80% des tatsächlichen Hb.-Gehaltes gemessen werden konnten. Die mittlere Ausbeute bei Recovery-Versuchen betrug bei Zugabe von Hb.-Standardlösung zu Plasma mit bekanntem Hb.-Gehalt 92%; bei Plasma mit bekannter Hb.-Konzentration 89%. Diese veränderte Methode wurde angegeben, um Hämoglobinkonzentrationen von 0,2-2,0 mg/100 ml genauer messen zu können. Nach HANKS soll sie keine Vorzüge gegenüber der von CROSBY und FURTH ausgearbeiteten Arbeitsweise haben, die nur zum Erfas-

sen von Hb.-Konzentrationen über 4 mg/100 ml geeignet sei. Die Ausbeute von rund 90% unterstreicht die hohe Empfindlichkeit der von HANKS beschriebenen Modifikation. Interessanterweise konnte bei keinem der Versuche ein ausgeprägter, sonst typischer Hemmeffekt durch das anwesende Plasma beobachtet werden. Der Grund für diese abweichende Beobachtung ist nicht klar, kann jedoch darin liegen, dass die Entwicklung des bereits nach 3,5 Minuten gemessenen grünen Farbtones nicht gehemmt wird, wie dies beim echten Benzidinblau der Fall ist.

GABRIELI und PYZIAIEWICZ arbeiteten zur Bestimmung des Hb.-Gehaltes im Plasma statt mit Benzidin mit in Wasser gelöstem Guajakol. Die Hemmwirkung des Plasmas eines jeden Patienten bestimmten sie an Hand standardisierter Hämoglobinlösungen. Sie gaben zu 0,1 ml Plasma 5,0 ml des von ihnen aus "Hematest"-Tabletten bereiteten Farbreagens. Das Gemisch blieb 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen und wurde dann bei 630 nm in einem Coleman-Universal-Spektrophotometer gemessen. Das Plasma eines jeden Patienten wurde zum Feststellen der Peroxidase-Hemmung geeicht, indem einerseits seine "Grundaktivität", andererseits der Aktivitätsanstieg nach Zugabe von 3 bekannten Hämoglobinemengen bestimmt wurde. Die Farbintensität dieser Hämoglobin-Guajakol-Mischung war temperaturabhängig. Die grösste Farbausbeute lag bei 20° nach 30 Minuten. Höhere Temperaturen ergaben eine geringere Färbung. Bei 20°

war die Farbausbeute bei Anwesenheit von Plasma im Reaktionsgemisch wesentlich geringer. Belichtung oder völlige Dunkelheit waren so gut wie ohne Einfluss, die belichteten Ansätze waren etwas weniger gefärbt. Die Farbentwicklung wässriger Hämoglobinlösungen mit der Guajakol-Lösung stellte eine lineare Funktion der Hämoglobinkonzentration dar. Diese linearen Verhältnisse werden durch die Anwesenheit von Plasma verändert. Deswegen sollen wässrige Hämoglobinlösungen nicht verwendet werden, um die Peroxidase-Aktivität im Plasma zu bestimmen. Diese fällt dann geringer aus. In weiteren Experimenten fanden sie bei Verwendung von Benzidin ebenfalls eine Verminderung der Peroxidase-Aktivität, wie sie schon von anderen Autoren beschrieben worden war. Im Mittel ergaben die Versuche eine Gesamtausbeute von 57,6% nach der ersten Hämoglobinzugabe, 59,9% nach der zweiten und 64,6% nach der dritten Zugabe. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die bei wässrigen Hämoglobinlösungen erreichten Werte.

NAUMANN beschrieb eine andere Möglichkeit, diese Fehlerquelle zu beseitigen. Er gab zu den Standard-Hb.-Ansätzen (und zu den Blindproben) Wasserstoffperoxid, um das Plasma-hämoglobin zu deaktivieren. Dann gab er bekannte Hb.-Mengen zu den Standardansätzen und verglich die Ergebnisse mit denen der Ansätze mit unbekanntem Plasma.

Nach GABRIELI und PYZIKIEWICZ ergibt Benzidin eine

intensivere Farbe als Guajakol und ist auch empfindlicher, jedoch weniger stabil und die Handelsqualitäten sind sehr unterschiedlich. Wegen seiner grösseren Empfindlichkeit vermittelt zwar Benzidin einen höheren Wert gegenüber Guajakol, es schaltet aber leider nicht die Beeinträchtigung durch das Plasma aus, so dass bei kleinen Hämoglobinemengen zu niedrige Werte gefunden werden. Da die Art und Weise der Hemmwirkung des Plasmas auf die Peroxidase-Aktivität noch unbekannt sei, wird betont, dass es sinnvoller sei, den Hemmeffekt einzuberechnen indem man ihn in seiner Grösse bestimme, als ihn etwa durch Verminderung der Plasmamenge in den Proben zu verkleinern.

WEBER gibt für die Luminolreaktion, ebenfalls eine Peroxidaserreaktion, an, dass fast lineare Beziehungen zwischen der Blutkonzentration und der Lumineszenzintensität bestehen. Lediglich bei grossen Hämoglobinemengen erhielt er etwas geringere Intensitätswerte, als der Linearität entsprach.

2. Reagentien und Methoden

Das Benzidinreagens wurde in Anlehnung an SCHWARZ und LIANG als 2% Lösung hergestellt: 1 g Benzidinpulver wurde unter leichtem Erwärmen in 10 ml Eisessig gelöst, etwas abkühlen gelassen und mit absolutem Alkohol auf 50ml aufgefüllt. Vor dem Gebrauch wurde es noch etwa 30 Minuten stehengelassen.

Das Peroxid, das in 0,6% und 3% Stärke benutzt wurde, stellt man aus der stabilisierten 30% Lösung her, wobei zum Verdünnen zweckmässig Aqua bidest. genommen wird, da sich der Metallionengehalt normal destillierten Wassers ungünstig auf die Stabilität der Lösung auswirken kann.

Die für die Versuche genommene Blutlösung hatte eine Grundverdünnung von 1:100 und wurde aus dem mit 1% Na-Zitrat ungerinnbar gemachten, frischen Vollblut mit Aqua dest. hergestellt, so dass gleichzeitig Hämolyse eintrat.

Der Hb.-Gehalt des frischen Vollblutes wurde nach der Oxihämoglobinmethode entsprechend den Anweisungen zum Photometer "Eppendorf" bestimmt. Im Prinzip misst man nach der Hämolyse des Blutes in einer alkalischen Verdünnungslösung die Extinktion der Oxihämoglobinlösung in 10 mm-Küvetten bei einem Filter von 578 nm.

Der bei der Benzidinreaktion entstandene blaue bzw. purpurne Farbton wurde nach CREDITOR bei 490 nm gemessen. Aus technischen Gründen wurde bei Gebrauch des "Eppendorf"-Photometers der Filter 546 nm benutzt, mit dem auch SCHLEYER und SELLIER arbeiteten.

3. Vorversuche

In einem groborientierenden Versuch wurden je 3 ml einer Blutlösung 1:100, 1:200 und 1:1000, die aus der Grundver-

dünnung des Vollblutes hergestellt waren, abgemessen und in Reagensgläsern mit je 2 Tropfen einer 2% Benzidinlösung und nach dem Mischen mit 2 Tropfen 3% H_2O_2 -Lösung versetzt. Bei einem zweiten Ansatz wurde ebenso verfahren, jedoch waren die Reagentienmengen wegen des Gebrauches einer anderen Tropfpipette absolut höher. Die Extinktion wurde gegen einen Reagentienblindwert ohne Blutzusatz, jedoch mit entsprechender Menge Wasser, bei 546 nm zu verschiedenen Zeiten gemessen (Tabelle III).

Die Extinktionswerte lassen erkennen, dass die Benzidinreaktion bei kleinen Abweichungen der Reagentienmenge deutlich andere Messwerte ergibt. Unter a) hatte die Blaufärbung schon nach 40 Minuten ihr Maximum erreicht und blieb bis zum 80-Minutenwert praktisch konstant. Unter b) konnte der Farb-
anstieg im Zeitbereich unter 30 Minuten makroskopisch deutlich beobachtet werden. dann sanken die Extinktionswerte ganz langsam ab, was besonders am 17-Stundenwert abgelesen werden kann. Lediglich bei der Verdünnung 1:1000 zeigte sich zunächst noch eine etwas ansteigende Farbtiefe.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden in ähnlicher Weise jeweils 3 ml der gleichen Blutverdünnungen mit jeweils wechselnden Mengen von Benzidinlösung und Wasserstoffperoxid angesetzt; Extinktionsmessung in der Zeit zwischen 3 und 75 Stunden (Tabelle IV). Die Reaktion sprach, ablesbar an der

Tabelle III. Drei Blutverdünnungen werden unter a) bzw. b) mit verschiedenen Reagentienmengen (bei $a < b$) angesetzt. Extinktionsmessung (E) gegen Reagentienblindwert bei 546 nm nach verschiedenen Zeiten t

$E \times 10^3$	a			b		
Blutverdünnung	1:100	1:200	1:1000	1:100	1:200	1:1000
t = 30 min.	---	---	---	803	656	413
40	545	458	360	795	650	404
50	543	456	358	789	645	405
60	544	458	358	782	640	408
70	543	458	357	775	634	412
80	544	458	358	767	629	413
90	---	---	---	760	625	415
100	---	---	---	753	618	416
110	---	---	---	745	613	419
120	---	---	---	740	608	420
130	---	---	---	730	603	422
17 h	---	---	---	666	512	346

Farbtiefe, gut auf eine Veränderung der Reagentienmengen an. Jedoch wuchs die Farbtintensität nicht proportional den erhöhten Mengen an Reagentien. Weiterhin ist deutlich, dass das Reaktionsgemisch nach längerem Stehenlassen nicht mehr

Tabelle IV. Gleiche Blutmengen (3 ml) verschiedener Blutverdünnungen (a = 1:100; b = 1:200; c = 1:1000) mit wechselnden Reagentienmengen. Extinktionsmessung ($E \times 10^3$) nach verschiedenen Zeiten t

A = 0,02 ml 2% Benzidinreagens und 0,02 ml 3% H_2O_2

B = 0,04 ml 2% Benzidinreagens und 0,04 ml 3% H_2O_2

C = 0,06 ml 2% Benzidinreagens und 0,06 ml 3% H_2O_2

D = 0,08 ml 2% Benzidinreagens und 0,08 ml 3% H_2O_2

E = 0,10 ml 2% Benzidinreagens und 0,10 ml 3% H_2O_2

t in Stunden		3	4	5	6	22	72	75
A	a)	445	421	411	405	417	455	464
	b)	197	199	204	204	216	250	265
	c)	93	92	92	90	85	80	95
B	a)	465	469	467	486	484	536	540
	b)	300	296	291	293	269	302	315
	c)	208	205	202	198	179	148	162
C	a)	583	574	561	577	552	600	609
	b)	420	412	405	399	359	371	384
	c)	315	314	311	309	266	219	235
D	a)	646	626	628	629	589	636	637
	b)	497	490	460	458	415	416	430
	c)	405	402	397	394	321	272	285
E	a)	689	676	663	667	598	652	655
	b)	574	556	541	533	460	450	465
	c)	430	425	418	411	288	210	225

so konstant im Farbton ist, bzw. auch nicht so langsame Farbveränderungen ergibt, wie im vorigen Versuch (Tabelle III). Jedenfalls kann die Reaktion zwischen 1 und 2 Stunden gut abgelesen werden, da in diesem beobachteten Zeitraum die optische Dichte der Farbtönung relativ konstant ist.

Um das Reaktionsgemisch nach der Reaktionszeit jeweils genau auf das gleiche Volumen auffüllen zu können, wurde in den folgenden Versuchen mit 50 ml-Messkölbchen gearbeitet. Weiterhin wurde die Peroxidmenge möglichst gering gehalten, wie dies von McFARLANE-McKENZIE-HAMILTON empfohlen worden ist. Daher wurde jetzt statt der 3% eine 0,6% H_2O_2 -Lösung benutzt. Ihre absolute Menge wurde ferner auf 0,01 ml herabgesetzt. Die Benzidinlösung dagegen blieb auf 2% eingestellt, wurde aber auf 0,05 ml je Ansatz gesenkt. Bei einer kleinen Doppelbestimmung wurde folgendermassen verfahren:

1. Einpipettieren der Benzidinlösung (0,05 ml 2%)
2. Einpipettieren der Blutlösung (0,3 ml 1:100)
3. Zugabe einer kleinen Menge Aqua dest. (ad 3 ml)
4. Mischen
5. Einpipettieren der Peroxidlösung (0,01 ml 0,6%)
6. Mischen
7. 60 Minuten nach der Peroxidzugabe wurden die Kölbchen mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt
8. Mischen und nach weiteren 15 Minuten Messen der Extinktion im Photometer bei 546 nm

Bei der folgenden Doppelbestimmung wurde nicht nur nach 75 Minuten, sondern auch nach 90 und 105 Minuten abgelesen. Im gemessenen Zeitraum bestand Farbkonzanz (Tabelle V). Die

Tabelle V. Doppelbestimmung in 50 ml-Messkölbchen nach im Text beschriebener Verfahrensweise. Extinktion $\times 10^3$

t: (min)	75	90	105
1. Bestimmung	88	87	87
2. Bestimmung	86	86	86

unter Punkt 3 angegebene Zugabe einer kleinen Menge Aqua dest. ist so zu verstehen, dass mit ihr in den weiteren Messreihen, in denen steigende Mengen Blutlösung angesetzt werden, ein Ausgleich des Volumens in den einzelnen Kölbchen erreicht wird. Die Farbreaktion vollzieht sich also in allen Kölbchen der Messreihe in einem gleichen Volumen.

Auf diese Weise wurden nach dem obigen Schema nacheinander zwei Messreihen angesetzt, in denen die Menge der Blutlösung von 0,2-2,0 ml in Stufen von 0,2 ml ansteigt. Ein Reagentienblindwert lief mit. Die Benzidinmenge betrug in allen Kölbchen 0,05 ml 2%, vom Peroxid wurden 0,01 ml der 0,6%-Lösung genommen. Extinktionsmessung nach 75 Minuten. Einen Überblick vermittelt die Tabelle VI. An den beiden Messreihen fällt auf, dass sie weder in sich einen linearen Farbanstieg bieten, noch untereinander übereinstimmen.

Tabelle VI. 2 Messreihen von 0,2-2,0 ml 1:100 Blutlösung in 50 ml-Kölbchen mit 0,05 ml 2% Benzidinlösung und 0,01 ml 0,6% H_2O_2 . Extinktionsmessung ($E \times 10^3$) 75 min. nach Peroxidzugabe gegen Reagentienblindwert (BW)

Kölbchen:	BW	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Blutlösung	---	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Aqua dest.	3,0	2,8	2,6	2,4	2,2	2,0	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0
$E \times 10^3$ 1.	---	0	23	42	80	83	90	84	105	74	76
2.	---	7	33	82	100	105	114	108	102	130	120

Um eine weitere Kontrollmöglichkeit in die Hand zu bekommen, wurde eine neue Messreihe angesetzt mit Blutchargen von 0,5-5,0 ml in 0,5 ml-Schritten (Tabelle VII). Die Ergeb-

Tabelle VII. Entsprechend Tabelle VI, es wurde jedoch eine Blutverdünnungsreihe von 0,5-5,0 ml verwendet.

Kölbchen:	BW	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Blutlösung	---	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Aqua dest.	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	---
$E \times 10^3$	---	16	70	62	73	75	62	46	65	70	67

nisse waren auch in dieser Reihe unbefriedigend. Zwar entstand schon wenige Minuten nach Reaktionsbeginn in allen Kölbchen eine intensive Blaufärbung, diese blasste aber in verschiedenem Masse ab. Nach etwa 30 min. bestand die blaue Farbe nur noch in den ersten beiden Kölbchen, die anderen

zeigten einen Rotbraunton. Nach 40 Minuten war im 2. Kölbchen ein wasserhelles Blaugrün. Nach 60 Minuten war die Farbe im Kölbchen 1 blassblau, bis zum 5. hin purpurrot, dann weiter bis zum 10. gelbrot. Offensichtlich kann die Farbreaktion in dieser Verdünnung und bei dieser geringen Reagentienmenge nicht richtig ablaufen. In der Kölbchenreihe war ein deutliches An- und Absteigen des Farbtones zu erkennen.

Im Folgenden wurden deshalb die Reagentienmengen vergrößert. Die Versuchsanordnung blieb die gleiche, wie sie oben ausführlich beschrieben wurde. Gegenüber dem vorigen Versuch änderte sich nur die Reagentienmenge, die verzehnfacht wurde (Tabelle VIII).

Tabelle VIII. Ergebnisse zweier Messreihen in 50 ml-Kölbchen mit 0,5-5,0 ml 1:100 Blutlösung und Reagentienchargen von 0,5 ml 2% Benzidinreagens und 0,1 ml 0,6% H_2O_2 . Messen der Extinktion ($E \times 10^3$) nach 75 Minuten. Reihe a) wurde mit alten, Reihe b) mit frischen Reagentien angesetzt.

Kölbchen:	BW	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Blutlösung	---	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Aqua dest.	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	---
a)	---	80	119	145	166	195	215	238	255	268	285
b)	---	180	212	269	310	336	393	410	430	445	460

Auffallend an den Messreihen ist, dass beide zwar einen kontinuierlichen Farbanstieg zeigen, jedoch in keiner Weise

in Einklang zu bringen sind. Die erste Reihe (a) stellt die Mittelwerte von mehreren, mit nicht mehr ganz frischen Reagentien vorgenommenen Messungen dar, während die zweite Messreihe (b) mit frischhergestellten Lösungen angesetzt wurde. Es ist also falsch, ein Benzidinreagens vom Vortage zu verwenden, auch wenn es in brauner Flasche aufbewahrt worden ist. Ebenso ändert die verdünnte Peroxidlösung rasch ihren Prozentgehalt. Die Farbausbeute bei Verwendung überalteter Reagentien ist viel niedriger als bei jeweils frisch angesetzten Lösungen. Makroskopisch betrachtet fiel weiter bei der 2. Messreihe auf, dass die Färbung zunächst viel tiefer blau war und dann mehr einen purpurnen Ton annahm entgegen dem mehr bräunlichen Endton der 1. Reihe.

4. Hauptversuche

a) Versuche mit Rinderblut

Um eine Eichkurve aufstellen zu können, wurde bei einem frischen, zitrierten Rinderblut der Hämoglobinwert nach der Oxihämoglobinmethode gemessen. 20 cmm frisches Blut wurden in 5,0 ml 0,04% Ammoniaklösung hämolysiert. Anschliessend wurde die Extinktion in einer 10 mm-Küvette bei Filter 578 nm gegen Wasser gemessen. Nach der Formel

$$\text{Extinktion} \times 26,3 = \text{g Hb./100 ml Blut}$$

liess sich der Hb.-Wert berechnen. 6 Messungen ergaben einen Mittelwert von $E = 0,464$, der Hb.-Wert des Blutes betrug also $12,1 \text{ g}/100 \text{ ml}$. Von diesem Blut wurde wieder eine 1:100 Verdünnung hergestellt. Das 2% Benzidinreagens und die 0,6% H_2O_2 wurden bei jedem Versuch frisch angesetzt, wie vorher beschrieben. Angesetzt wurden 50 ml-Kölbchen, je Reihe ein Blindwert und 10 Proben. Es wurde im Einzelnen folgendermassen verfahren:

1. In jedes Kölbchen 0,5 ml 2% Benzidinreagens
2. In die Kölbchen 1-10 0,5-5,0 ml Blut 1/100 in Schritten zu 0,5 ml
3. Aqua dest. ad 5,0 ml, gut mischen
4. In jedes Kölbchen 0,1 ml 0,6% H_2O_2

Vom Zeitpunkt der Peroxidzugabe an gerechnet wurden die Ansätze 2 Stunden stehen gelassen, dann mit Wasser aufgefüllt und wieder gemischt. Nach weiteren 30 Minuten wurde die Extinktion bei 546 nm bestimmt (Tabelle IX). Gegenüber dem letzten Vorversuch war also die Reaktionszeit verlängert. Da jedoch nach knapp einer Stunde nach Reaktionsbeginn für einige Stunden praktisch Farbkonzanz besteht, stellte diese Massnahme keine besondere Änderung dar, wenn bei allen zugehörigen Versuchen die gleiche Wartezeit eingehalten wurde. Die Änderung wurde eingeführt, um mehrere Versuchsreihen parallel laufen lassen zu können, wodurch Zeit und Reagentien eingespart werden konnten.

Tabelle IX. 10 Messreihen mit 12,1 g/100 ml Hb.-Rinderblut 1:100 verdünnt von 0,5-5,0 ml, angesetzt in 50 ml-Messkölbchen mit 0,5 ml 2% Benzidinreagens und 0,1 ml 0,6% H₂O₂. Messen der Extinktion ($E \times 10^3$) nach insgesamt 2^h 30' bei 546 nm gegen einen Blindwert (BW). Der Mittelwert stellt die Kurve 1 dar

Kölbchen	BW	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Blutlösung	---	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Aqua dest.	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	---
1)	---	176	215	270	297	343	405	440	465	503	527
2)	---	179	214	251	309	359	401	421	455	491	526
3)	---	155	223	282	314	350	385	418	467	498	506
4)	---	185	238	280	320	360	410	423	462	487	504
5)	---	183	232	304	327	373	409	476	490	520	530
6)	---	202	253	311	360	397	433	450	506	523	530
7)	---	164	207	279	305	344	390	432	455	490	514
8)	---	183	243	270	320	374	405	436	456	494	508
9)	---	166	221	280	302	345	380	406	444	480	495
10)	---	181	221	276	315	352	390	422	451	455	496
Mittelwert	---	177	227	280	317	360	401	432	465	494	514

In gleicher Weise wurde mit einem zweiten frischen Rinderblut verfahren. Die Hb.-Messung ergab einen Gehalt von 12,7 g/100 ml. In genau der gleichen Weise wurden 10 Reihen für eine zweite Eichkurve gemessen (Tabelle X). Aus den beiden Versuchen ergaben sich zwei Eichkurven, Kurve 1 für

Tabelle X. Gleiche Versuchsanordnung wie zu Tabelle IX.
Das Rinderblut hatte einen Hb.-Gehalt von 12,7 g/100 ml. Der
Mittelwert der Messungen stellt die Kurve 2 dar

Kölbchen	BW	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bluttlösung	---	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Aqua dest.	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	---
1)	---	185	246	323	373	410	437	466	510	540	568
2)	---	218	278	335	391	417	462	485	505	533	550
3)	---	206	250	323	372	406	441	467	488	543	546
4)	---	184	244	330	368	401	440	472	510	530	552
5)	---	195	248	313	353	368	422	458	503	550	544
6)	---	171	243	315	345	418	421	461	485	532	554
7)	---	210	251	313	356	378	444	475	492	522	543
8)	---	165	243	319	340	396	416	469	478	539	556
9)	---	198	251	305	340	389	419	459	481	521	529
10)	---	174	242	310	355	394	419	457	480	504	515
Mittelwert	---	191	250	319	359	398	432	467	494	531	546

Rinderblut von 12,1 g Hb./100 ml bei einer Verdünnung von
1:100 und Kurve 2 für Rinderblut von 12,7 g Hb./100 ml bei
gleicher Verdünnung. Die graphische Darstellung der beiden
Eichkurven zeigt Abb. 1.

Mit dem Rindervollblut von 12,7 g Hb./100 ml, das in der
Verdünnung 1:100 der Eichkurve 2 zugrunde liegt, wurden

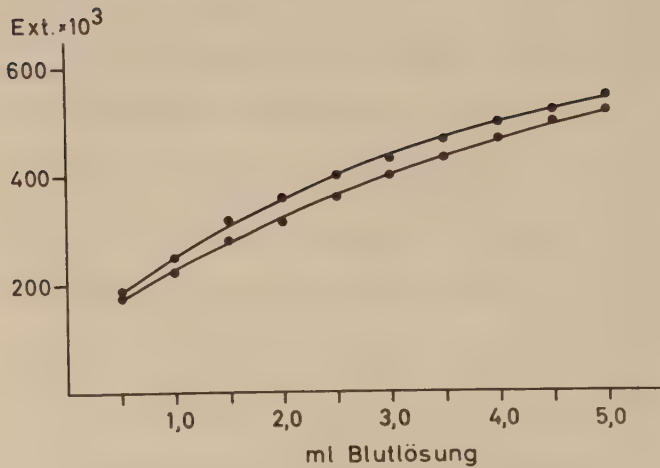


Abb. 1. Eichkurven zweier Rinderblute von 12,1 (untere) und 12,7 g Hb./100 ml (obere Kurve) bei einer Blutverdün-
nung von 1:100

Flecken auf weissem Leinenstoff hergestellt. Die ausgegossene Blutmenge je Fleck betrug 20 bzw. 50 ml. Der Stoff wurde, um ein Abtropfen des Blutes zu vermeiden, zunächst 4- bis 8-fach zusammengelegt. Danach wurden die befleckten Stoffstücke auseinandergefaltet und bei Zimmertemperatur an der Luft zum Trocknen aufgehängt. Nach wenigen Stunden waren die Blutflecken trocken und wurden anschliessend mit Wasser extrahiert. Es wurde jeweils der ganze Fleck ausgewaschen. Danach wurde das verfärbte Eluat jedes Flecken nach einiger Zeit abgegossen und in Gefässen im Kühlschrank gesammelt. Durch Umrühren und Stampfen konnte die Entfärbung des befleckten Gewebes beschleunigt werden. Der Stoff wurde jedoch nie ganz weiss, sondern er behielt immer noch eine geringe Tönung. Die Extraktion wurde fortgeführt, bis das Eluat farblos war. Nun wurde die Eluatmenge bestimmt, und ein Aliquot - hier 2,5 ml - ging in den Ansatz ein. Die Verhältnisse waren hier identisch mit denen der Ansatzreihen zum Erstellen der Eichkurve. An Hand mehrerer Messungen wurde eine mittlere Extinktion bestimmt. Dieser Extinktionswert wurde dann auf der Eichkurve aufgesucht; dann wurde auf der Abszisse der entsprechende ml-Wert an 1:100-Blut abgelesen. Die gefundene Blutmenge ergab sich aus folgender Gleichung:

$$x = \frac{E \cdot a}{A \cdot v}$$

x = gefundene Blutmenge in ml

E = Volumen der Extraktionsflüssigkeit

a = abgelesener Wert 1:100-Blut in ml

A = angesetzte Reaktionsmenge Extrakt in ml

v = Grundverdünnung des Eichkurvenblutes (1:100)

Messung gegen einen Blindwert; die zum Ansatz benötigte Extraktmenge wurde durch Auswaschen eines dem Blutfleck gleichgrossen, jedoch sauberen Stoffstückes gewonnen. Die durchschnittliche Fleckengrösse betrug auf dem verwendeten Leinenstoff für Flecken mit 20 ml Blut etwa 1400-1700 cm², für Flecken mit 50 ml Blut 3200-3800 cm². Extrahiert wurden 4 Flecken zu je 20 ml Blut und 5 Flecken zu je 50 ml Blut. Von jedem Fleckenextrakt wurden 3 Proben angesetzt und gemessen. Einen Überblick gibt die Tabelle XI. In jedem Fall lag die Ausbeute über 100%. Die Fehlerbreite schwankte zwischen + 8 und + 28%. Der Mittelwert lag bei + 21%!

Als Beispiel für die Berechnung der gefundenen Blutmenge x stehe Fleck 1 :

$$x = \frac{E \cdot a}{A \cdot v} = \frac{1500 \cdot 4,05}{2,5 \cdot 100} \\ = 24,3 \text{ ml}$$

Tabelle XI. Blutmengenbestimmung an 9 Flecken von 20 bzw. 50 ml 12,7 g Hb./100 ml Vollblut, entsprechend der Eichkurve 2 (s. Tabelle X und Abb.1). Ansatz mit je 2,5 ml des Extraktes. Messen der Extinktion ($E \times 10^3$) nach 2^h 30' bei 546 nm

Fleck Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ml Blut	20	20	20	20	50	50	50	50	50
Extrakt- volumen	1500	2000	2000	2000	5000	5000	5000	5600	7000
1)	486	445	424	395	429	413	440	416	370
2)	510	454	455	451	441	409	462	432	380
3)	512	426	431	456	426	416	444	415	375
Mittelwert	502	441	436	434	432	413	448	421	375
Abgelesener Blutwert	4,05	3,10	3,00	3,00	2,95	2,70	3,20	2,77	2,20
Gefundene Blutmenge	24,3	24,8	24,0	24,0	59,0	54,0	64,0	62,0	61,6
% Ausbeute	122	124	120	120	118	108	128	124	125
% Fehler	+ 21	+ 24	+ 20	+ 20	+ 18	+ 8	+ 28	+ 24	+ 25

b) Versuche mit Menschenblut

Vor der Blutentnahme wurde eine Hb.-Bestimmung an Kapillarblut aus dem Ohrläppchen vorgenommen. Die Doppelbestimmung ergab eine mittlere Extinktion von 0,560, was einem Hämoglobingehalt des Blutes von 14,7 g Hb./100 ml entspricht.

In ein Glasgefäß wird Na-Zitrat eingewogen. Das venöse Blut wurde dann in diesem Gefäß aufgefangen. Wie das Tierblut hat das Menschenblut einen Na-Zitrat-Gehalt von 1%. Es wurde wiederum eine 1:100-Blutlösung hergestellt.

1,0-5,0 ml dieser Blutlösung wurden entsprechend den Tierblutversuchen mit 0,5 ml 2% Benzidinreagens und 0,1 ml 0,6% H_2O_2 in 50 ml-Messkölbchen angesetzt. Die Extinktion wurde nach 2^h 30' bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen (Tabelle XII). Der Anstieg der Extinktionswerte von 1,0 auf

Tabelle XII. 1,0-5,0 ml des 1:100 verdünnten Menschenblutes von 14,7 g Hb./100 ml wurden mit 0,5 ml 2% Benzidinreagens und 0,1 ml 0,6% H_2O_2 angesetzt. Extinktion ($E \times 10^3$) bei 546 nm 2^h 30' nach Peroxidzugabe

ml Blutlösung	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
1)	284	306	318	326	364
2)	295	291	316	324	344
Mittelwert	290	299	317	320	354

5,0 ml Blutlösung war so gering, dass die Werte in dieser Form kein klares Bild der vorhandenen Blutmenge abgeben. Es wurde deshalb versucht, ob die Reaktion bei erhöhter Peroxidmenge ein besseres Ergebnis brachte. Statt der 0,6% wurde eine 3% H_2O_2 -Lösung eingesetzt. Es wurden die Extinktionswerte von 0,5-5,0 ml Blut bei einer Charge von 0,25; 0,50; 0,75 ml

3% H_2O_2 , einer Menge von 0,5 ml 2% Benzidinreagens und nach verschiedenen Reaktionszeiten bestimmt. (Tabelle XIII).

Tabelle XIII. Einfluss verschiedener Peroxidmengen (ml 3%) und der Reaktionszeit bei gleichbleibender Blut- und Benzidinmenge auf den gemessenen Extinktionswert ($E \times 10^3$)

Minuten nach Peroxidzugabe	45	80	100	140	180
ml Blut 1:100	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
0,25 ml Peroxid	320	420	470	545	598
0,50 ml Peroxid	480	600	640	700	748
0,75 ml Peroxid	565	660	690	740	780
ml Blut 1:100	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
0,25 ml Peroxid	1315	1303	1305	1300	1300
0,50 ml Peroxid	1965	1955	1950	1985	1930
0,75 ml Peroxid	2265	2270	2255	2235	2285

Die Ergebnisse dieses Versuches waren viel besser. Die Extinktionswerte zeigten eine deutliche Abhängigkeit von den gegebenen Blutmengen. Weiterhin wird deutlich, dass bei nicht zu kleinen Blutmengen schon nach sehr kurzen Reaktionszeiten wie 45 Minuten Farbkonzanz besteht und wenigstens auch im gemessenen Zeitraum bestehen blieb. Nur bei sehr kleinen Blutkonzentrationen stiegen die Extinktionswerte von Ab-

lesung zu Ablesung noch deutlich an. Dieses Klettern der Werte bei den kleinsten Blutverdünnungen bereitet jedoch bei der Photometerablesung keinerlei Schwierigkeiten. Natürlich muss man, um gerade die niedrigen Werte exakt messen zu können, die Reaktionszeit peinlich genau einhalten. Ausserdem ist eine starke Abhängigkeit der Werte von der Peroxidmenge abzulesen. Um in einen Bereich des Photometers zu kommen, in dem die Ablesegenauigkeit möglichst gross ist, mussten wir die H_2O_2 -Menge jedoch noch etwas erniedrigen. Die Gesamtreaktionszeit wurde von $2^h 30'$ auf $60'$ herabgesetzt, da dann Extinktionen erzielt wurden, die von kleinen zu grossen Blutmengen eine relativ grössere Spanne aufwiesen und so eine genauere Bestimmung ermöglichten (s. Tabelle XIII).

Zur Aufstellung einer Eichkurve wurden ein Blindwert und Blutmengen von 0,25-5,0 ml des 1:100 verdünnten Blutes von 14,7 g Hb./100 ml mit jeweils 0,5 ml 2% Benzidinreagens und 0,1 ml 3% H_2O_2 in 50 ml-Messkolben angesetzt. 50 Minuten nach der Peroxidzugabe wurden die Kölbchen mit Aqua dest. aufgefüllt und nach insgesamt genau 60 Minuten die Extinktion im Photometer in 10 mm-Küvetten bei Filter 546 nm gemessen (Tabelle XIV). Es wurden 5 Reihen gemessen und die Standardabweichung σ nach der Formel

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n}}$$

berechnet. $\bar{x}$ = Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert $\bar{x}$.

Tabelle XIV. Messung steigender Blutmengen (14,7 g Hb./100 ml 1:100 verdünnt) in 50 ml-Kölbchen mit 0,5 ml 2% Benzidinreagens und 0,1 ml 3% H_2O_2 nach einer Zeit von 60 Minuten nach Peroxidzugabe bei Filter 546 nm

Kölbchen	BW	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Blutlösung	---	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0
Aqua dest.	5,0	4,75	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,0	---
1)	---	155	290	522	760	869	950	1024	1142	1231
2)	---	153	283	528	695	820	939	998	1160	1219
3)	---	154	289	504	723	854	950	1061	1112	1261
4)	---	169	290	507	706	839	989	1002	1160	1201
5)	---	156	287	512	710	856	952	1032	1140	1220
Mittelwert	---	157	288	515	719	842	956	1015	1143	1226
σ	---	6	3	9	22	18	17	24	18	20

Die gefundenen Mittelwerte sind in Abb. 2 als Eichkurve (1) graphisch dargestellt.

Mit dem zitrierten Menschenblut von 14,7 g Hb./100 ml wurden 6 Flecken von jeweils 20 ml auf Leinenstoff hergestellt. Die Flecken wurden 6 Tage bei Zimmertemperatur frei aufgehängt und getrocknet, darauf für gut 4 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. Die Extraktion geschah in gleicher Weise wie bei den Tierblutflecken. Je 1,5 ml des Eluates wurden dann in

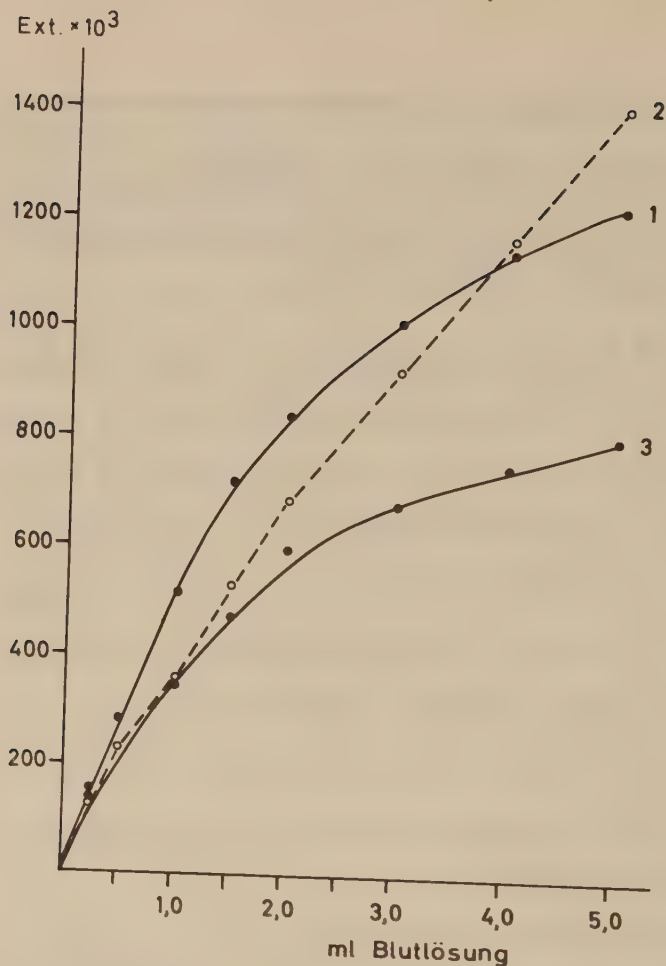


Abb. 2. Eichkurve 1 mit Menschenblut von 14,7 g Hb./100 ml 1:100 verdünnt, frisch (vgl. Tabelle XIV)
 Kurve 2: Messwerte der Kontrolle mit der 6 Wochen alten Blutlösung (vgl. Tabelle XVI)
 Eichkurve 3 mit hämoglobinisiertem Menschenblut entsprechend Eichkurve 1 (vgl. Tabelle XVII)

50 ml-Kölbchen mit 0,5 ml 2% Benzidinreagens und 0,1 ml 3% H_2O_2 angesetzt, und nach 60 Minuten wurde die Extinktion abgelesen (Tabelle XV). Die Werte wurden gegen einen Blindwert gemessen, zu dessen Ansatz neben den Reagentien der Extrakt aus einem den Flecken entsprechenden Stück sauberen Stoffes verwendet wurde.

Tabelle XV. Ausbeuten bei Blutflecken von je 20 ml, die 6 Tage an der Luft und 4 Wochen im Kühlschrank gelagert haben. Ansatz mit je 1,5 ml des Fleckenextraktes (s. Text)

Fleck Nr.	1	2	3	4	5	6
ml Blut	20	20	20	20	20	20
Extrakt- volumen	2100	2100	2300	2400	2400	2500
1)	396	359	387	342	357	387
2)	393	349	384	337	355	381
3)	385	349	388	342	352	379
Mittelwert	391	352	386	340	355	382
Abgelesener Blutwert	0,72	0,63	0,70	0,61	0,64	0,68
Gefundene Blutmenge	10,08	8,82	10,73	9,76	10,24	11,33
% Ausbeute	50,4	44,1	53,7	48,8	51,2	56,7
% Fehler	49,6	55,9	46,3	51,2	48,8	43,3

An den Ergebnissen fällt auf, dass die prozentuale Ausbeute bzw. der durchschnittliche Fehler rund 50% betragen. Zur Fehlersuche wurde zunächst die zugrundeliegende Eichkurve (Abb. 2 (1)) nachgemessen. Angesetzt wurde die Blutlösung von 14,7 g Hb./100 ml, mit der die Eichkurve erstellt worden war. Die Lösung war in der Zwischenzeit im verschlossenen Messkolben im Kühltank aufbewahrt worden und war jetzt ungefähr 6 Wochen alt. Die Verfahrensweise war die gleiche wie beim Aufstellen der Eichkurve. Das Ergebnis gibt Tabelle XVI wieder. Die Werte sind in Abb. 2 (2) graphisch dargestellt. Die Kurve nähert sich einer Geraden. Gegenüber

Tabelle XVI. Messwerte der Eichkurvenkontrolle mit 6 Wochen alter Blutlösung

Blutlösung	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0
1)	134	237	367	550	674	940	1195	1387
2)	117	220	350	505	693	910	1145	1430
Mittelwert	126	229	359	528	684	925	1170	1409

der Eichkurve erscheint sie gestreckt, so dass die Kurve im unteren Bereich deutlich tiefer liegt als diese, im oberen jedoch höher. Der Grund für diese Veränderung der Kurve liegt wahrscheinlich in einer teilweise eingetretenen Hämoglobinisierung der Blutlösung. Diese erschien auch wesentlich

brauner als in frischem Zustand. Zur weiteren Kontrolle wurden 100 ml der Blutlösung im offenen Becherglas für 48 Stunden bei $36-37^{\circ}$ inkubiert. Nach Volumenauffüllung wurde nochmals eine Doppelbestimmung gemacht. Die Mittelwerte der 8 Lesspunkte (entsprechend Tabelle XVI) wurden wie folgt bestimmt:

134 ; 222 ; 363 ; 526 ; 667 ; 896 ; 1146 ; 1385

Diese Werte weichen nur unwesentlich von den vorher gemessenen ab, so dass bei der Inkubation keine weitere erhebliche Veränderung des Blutes stattgefunden haben dürfte.

Um den grossen Ausbeutefehler zu verringern, wurde die starke Hämiglobinisierung des auf den Stoff gebrachten, feinverteilten Blutes vor dem Erstellen einer Eichkurve nachgeahmt. Daher wurde von derselben Person wieder Venenblut abgenommen und mit 1% Na-Zitrat ungerinnbar gemacht. In 2 grosse Bechergläser wurden je 5 ml dieses Vollblutes einpipettiert, ihr Boden war eben dünn bedeckt. Die Gefässe blieben bei Raumtemperatur offen stehen; nach 1-2 Tagen war das Blut völlig eingetrocknet. Die Trockenzeit entsprach etwa der frischgetränkten Stoffes. Nach 4 Tagen wurden die Proben gut mit Wasser bedeckt und ungefähr 2 Tage einweichen gelassen, was zeitlich der Fleckenextraktion gleichkam. Beide Proben zusammen ergaben, in einem Messkolben mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt, eine Blutverdünnung von 1:100. Diese hämi-

globinisierte, den Blutfleckenextrakten am nächsten kommende Blutlösung wurde zum Erstellen einer neuen Eichkurve genommen. Das Vorgehen und die Reagentien waren identisch mit denen der Eichkurve mit frischer Blutlösung entsprechend Tabelle XIV. Die Messergebnisse sind in Tabelle XVII zusammengestellt. Die Eichkurve, (3) in Abb.2, entspricht in ihrem Verlaufscharakter der Frischblutkurve, sie liegt nur wesentlich tiefer.

Tabelle XVII. Messergebnisse zur Eichkurve mit hämoglobinisiertem Blut

Kölbchen	BW	1	2	3	4	5	6	7	8
Blutlösung	---	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0
Aqua dest.	5,0	4,75	4,5	4,0	3,5	3,0	2,0	1,0	---
1)	---	148	226	356	470	603	661	752	820
2)	---	120	249	336	481	580	676	730	795
3)	---	139	243	353	465	567	686	741	774
4)	---	144	230	344	472	600	728	755	787
5)	---	146	200	346	471	614	701	770	842
Mittelwert	---	139	230	347	472	593	690	750	804
	---	10	17	7	5	17	23	13	24

Zur endgültigen Bestimmung der Blutmenge in Blutflecken verschiedenen Alters wurden zunächst die bereits die in der Tabelle XV zusammengestellten Messergebnisse von 6 Flecken

von je 20 ml an Hand der neuen, modifizierten Eichkurve neu-berechnet. Die Blutflecken waren 6 Tage bei Zimmertemperatur frei aufgehängt, darüber hinaus für 4 Wochen im Kühlschrank gelagert worden. Die Ausbeute gibt die Tabelle XVIII wieder.

Tabelle XVIII. Neuberechnung der in Tabelle XV aufgeführten Fleckenergebnisse

Fleck Nr.	1	2	3	4	5	6
ml Blut	20	20	20	20	20	20
Extrakt- volumen	2100	2100	2300	2400	2400	2500
Mittelwert	391	352	386	340	355	382
Abgelesener Blutwert	1,13	0,95	1,10	0,90	0,98	1,08
Gefundene Blutmenge	15,8	13,3	16,9	14,4	15,7	18,0
% Ausbeute	79,0	66,5	84,5	72,0	78,5	90,0
% Fehler	21,0	33,5	15,5	28,0	21,5	10,0

Weiterhin wurden 11 Flecken verschiedenen Alters extrahiert und ihr Blutgehalt festgestellt. Die Angaben über die Blutmenge, das Alter der Flecken und die Ausbeute sind aus den folgenden Tabellen XIX, XX und XXI zu entnehmen. Der mittlere Fehler betrug bei Flecken von 2 Tagen Alter 20%, bei 5 Tagen Alter 21% und bei 21 Tagen Alter 45%.

Tabelle XIX. 4 Blutflecken sind nach 2 Tagen extrahiert und ihre Blutmenge bestimmt worden. 1,5 ml des Extraktes gingen in den Versuch ein

Fleck Nr.	7	8	9	10
ml Blut	20	10	10	10
Extrakt- volumen	2350	1230	1110	1050
1)	376	364	382	407
2)	367	355	379	393
3)	371	363	370	386
Mittelwert	371	367	377	395
Abgelesener Blutwert	1,03	1,01	1,05	1,12
Gefundene Blutmenge	16,2	8,3	7,8	7,9
% Ausbeute	81	83	78	79
% Fehler	19	17	22	21

Längere Zeit nach Abschluss der eigenen Versuche wurde im Institut eine veränderte Art der Blutfleckenaufarbeitung entwickelt, die noch angeführt werden soll. Durch feinstes Zermahlen der Blutflecken in einer elektrischen Mühle gelang die Extraktion vollständiger. Zur Extraktion eignet sich besonders ein leicht alkalisches Lösungsmittel. Eigenen Zusatzversuchen dieser Art stand im Wege, dass keine gleichbehandel-

Tabelle XX. 4 Blutflecken sind nach 5 Tagen extrahiert und ihre Blutmenge bestimmt worden. 1,5 ml Extrakt wurden für den Ansatz verwendet

Fleck Nr.	11	12	13	14
ml Blut	20	10	10	10
Extrakt- volumen	2000	1000	1000	1100
1)	425	405	395	364
2)	402	385	417	356
Mittelwert	414	395	406	360
Abgelesener Blutwert	1,20	1,12	1,17	0,98
Gefundene Blutmenge	16,0	7,5	7,8	7,2
% Ausbeute	80	75	78	72
% Fehler	20	25	22	28

ten Blindwerte gewonnen werden konnten, da die Mühle - besonders an der Rotorachse - nie völlig blutfrei zu bekommen war. Weiter war bei der eigenen Versuchsanordnung eine Extraktion mit einem alkalischen Medium nicht angezeigt.

Aber nur in einem solchen konnte ein einwandfrei klares Eluat erzielt werden. Bei einer Extraktion mit Wasser lösten sich die kleinen, in der Mühle entstandenen Blutstaubklumpchen nicht auf und konnten auch durch mechanische Behandlung

Tabelle XXI. 3 Blutflecken sind nach 21 Tagen extrahiert worden. 1,5 ml Extrakt für den Ansatz

Fleck Nr.	15	16	17
ml Blut	20	10	5
Extrakt- volumen	2100	1100	550
1)	309	302	280
2)	295	337	288
Mittelwert	302	320	284
Abgelesener Kurvenwert	0,76	0,83	0,70
Gefundene Blutmenge	10,6	6,1	2,6
% Ausbeute	53	61	52
% Fehler	47	39	48

mit einem "Potter" nicht völlig entfernt werden. Schliesslich stellte sich heraus, dass nach Verbrauch des früher benutzten Benzidins bei Probeversuchen mit einer anderen Benzidincharge nicht identische Ergebnisse erzielt werden konnten. Daher hätten alle Versuche, besonders die Messungen zur Eichkurve, wiederholt werden müssen. Nach dem Abschluss der Versuche war dies jedoch nicht mehr möglich.

Da die einzelnen Benzidinqualitäten verschiedene Reaktionsstärke zeigen, muss darauf hingewiesen werden, dass also in

jedem Fall bei neuen Versuchen mit dem jeweils benutzten Benzidin auch gleichzeitig eine Eichkurve mit einem 1:100 verdünnten Vollblut normalen Hb.-Gehaltes erstellt werden muss.

IV. Schlussbesprechung

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass es unbedingt notwendig ist, alle Reagentien vor jeder Versuchsreihe frisch anzusetzen. Das Benzidinreagens konnte entgegen den Literaturangaben nicht - auch nicht in brauner Flasche - brauchbar aufbewahrt werden. Die einmal festgelegte Reaktionszeit ist genau einzuhalten, denn die Reaktion läuft bei bestimmten Blutkonzentrationen langsam weiter ab.

Die Fleckenausbeute fällt mit dem Alter der Blutflecken ab. Der mittlere Fehler beträgt bei Flecken bis zu 5 Tagen Alter rund 20% und bei 21 Tagen Alter 45%. Insgesamt muss also bei 2-21 Tage alten Flecken mit einem Ausbeutefehler von 27% im Mittel gerechnet werden.

Weiter haben die Versuche überraschenderweise gezeigt, dass es nicht gleichgültig ist, mit dem Blut welcher Species die Untersuchungen angestellt werden. Bei den Menschenblutflecken, berechnet an Hand der Eichkurve mit Menschenblut, lag die Ausbeute immer weit unter 100%. Auch musste die Kurve noch experimentell auf ein niedrigeres Niveau gebracht

werden. Dies geschah durch Eintrocknen des Vollblutes in dünner Schicht vor der Verdünnung. Durch diese Massnahme sind die Verhältnisse denjenigen der Blutfleckenextrakte angepasst worden. Beim Rinderblut dagegen lag die Ausbeute immer deutlich über 100%, es ergab sich also ein positiver Fehler. Auffallend war weiter, dass das beim Ansatz mit Rinderblutlösung gefundene Mengenverhältnis von Benzidinreagens und Peroxid bei Versuchen mit der gleichkonzentrierten Menschenblutlösung keine befriedigende Reaktion ergab. Erst nach drastischer Erhöhung der Reagentienmengen um das 10-fache konnte ein normaler Reaktionsablauf erzielt werden. Der Grund für das unterschiedliche Verhalten der Blute kann in einer Speciesdifferenz der Hämoglobine liegen, so dass es sich um eine ungleiche katalytische Wirkung verschiedener Hämoglobinarten handelt.

Weiterhin ist deutlich geworden, dass sich die Benzidinreaktion, wie überhaupt jede Peroxidasereaktion, dann nicht zur quantitativen Erfassung von Blut- oder Hämoglobinmengen eignet, wenn es sich bei dem Untersuchungsgut um Vollblut oder eine Vollblutverdünnung handelt. Die gleichzeitig anwesenden Serumbestandteile beeinflussen den Reaktionsablauf beträchtlich ("Auslöschphänomen"). Je höher der Anteil des Serum im Reaktionsgemisch ist, desto geringer wird die auf Grund des Hb.-Gehaltes zu erwartende Ausbeute. Dies ist

deutlich an den beiden Eichkurven in Abb. 2 zu ersehen; es bestehen also zwischen dem Vollblutgehalt des Reaktionsgemisches und der gemessenen Extinktion weder lineare, noch proportionale Verhältnisse. Dieser Tatsache ist dadurch begegnet worden, dass zu allen Messungen, besonders zum Erstellen der Eichkurven, eine Vollblutlösung eingesetzt worden ist. Auf diese Weise konnte der Ausbeutefehler, der durch die Anwesenheit von Serum bedingt ist, aufgehoben werden, da ja nicht, wie bei anderen Autoren angegeben, gegen eine Hämoglobinstandardlösung gemessen worden ist.

Die ebenfalls in Abb. 2 gezeigte, fast geradlinig verlaufende Kurve (2) veranschaulicht, dass dann, wenn es sich um eine alte Blutlösung handelt, in der das Serum bereits faulig verändert ist, die Reaktion plötzlich stöchiometrisch ablaufen kann. Dies rührt daher, dass die hemmende Wirkung des Serums fortgefallen ist.

Das Niveau einer Kurve (1) mit steigenden Mengen einer frischen Vollblutlösung liegt wesentlich höher als das einer Kurve (3), die mit einer hämoglobinisierten Blutlösung erstellt worden ist. Diese Verhältnisse geben die Kurven 1 und 3 in Abb. 2 wieder.

C. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war der Versuch, die Benzidinreaktion der quantitativen Blutbestimmung in Textilflecken nutzbar zu machen. Es wurden zunächst die Arbeiten über eine quantitative Hämoglobinmessung im Blutserum mit Peroxidasereaktionen herangezogen. Sodann wurden in zahlreichen Vorversuchen die optimalen Anteile der Reaktionspartner und die optimale Reaktionszeit festgelegt. Die erarbeitete Methodik wurde dann auf Fleckenextrakte bekannten Hämoglobingehaltes angewandt. Das bereits mehrfach beschriebene "Auslöschphänomen" der Peroxidasereaktion bei Anwesenheit von Serum wurde bestätigt und durch Benutzung einer Vergleichskurve aus Vollblut (an Stelle von Hämoglobinlösungen) umgangen. Die Eichkurve ist keine Gerade. Es ergaben sich Ausbeutedefizite von durchschnittlich 20%. Diese Methodik zur Ermittlung einer unbekannten Blutmenge ist also in der erarbeiteten Technik (entgegen der Erwartung) nicht besser als ältere Verfahren der gerichtlichen Medizin. Die Defizite sind jedoch höchstwahrscheinlich durch die nichtoptimale wässrige Extraktion der Blutflecken zu erklären. Die inzwischen im Institut ermittelte wesentliche Verbesserung der Blutextraktion aus Textilien durch mechanische Pulverisierung und Extraktion in schwach alkalischen Lösungen konnte aber aus methodischen Gründen für das Benzidinverfahren nicht angewandt werden.

D. Literatur

- BACH, A. und A.
KULTJUGIN: Über die Peroxydasefunktion des Oxy-
hämoglobins. Biochem. Z. 167, 227, 1926
- BING, F. and R.
BAKER: The Determination of Hemoglobin in
Minute Amounts of Blood by WU's Method.
J. Biol. Chem. 92, 589, 1931
- BROZEIT: Bestimmung der absoluten Blutmenge im
Thierkörper. Pflüger's Arch. 3, 353, 1870
- CREDITOR, M.: The Quantitative Determination of Plasma
Hemoglobin by the Benzidine Reaktion. J.
Labor. Med. 41, 307, 1953
- CROSBY, W. and F.
FURTH: A Modifikation of the Benzidine Method
for Measurement of Hemoglobin in Plasma
and Urine. Blood 11, 380, 1956
- McFARLANE, W. and R.
McKENZIE-HAMILTON: On the Factors Influencing the Blood-
Benzidine Reaction as Applied to the
Micro- Determination of Hemoglobin.
Biochem. J. 26, 1050, 1932
- GABRIELI, E. and T.
PYZIKIEWICZ: Assay of Lewel of Hemoglobin in Plasma.
Am. J. clin. pathol. 42, 4, 355, 1964
- HAM, T.: Studies on Destruction of Red Blood
Cells. Arch. Int. Med. 64, 1271, 1939
- HANKS, G., CASSEL, M., Further Modifikation of the Benzidine
RAY, R. and H. CHAPLIN: Method for Measurement of Hemoglobin
in Plasma. J. Lab. clin. med. 56, 486,
1960

- HAUASLI, G.: Vergleichende Messungen des Blutverlustes bei Operationen. Diss. Marburg 1965
- KRAFT, E.: Blutmengenbestimmung im Boden unter verschiedenen Verhältnissen. Diss. Würzburg 1939
- LEERS, O.: Die forensische Blutuntersuchung, Berlin (Springer) 1910
- LIANG, C.: The Formation of Complexes between Haemoglobins and Plasma Proteins. Biochem. J. 66, 552, 1957
- MARX, H.: Praktikum der gerichtlichen Medizin, Berlin 1907. Zit. nach O. LEERS: Die forensische Blutuntersuchung, Berlin 1910
- MITA, S.: Über die Methode der quantitativen Bestimmung versickerten Blutes. Mitt. med. Fak. Univ. Tokyo 8, 327, 1909
- NAUMANN, H.: The Measurement of Hemoglobin in Plasma. In SUNDERMAN, F. and F. SUNDERMAN jr. Hemoglobin. Its Precursors and Metabolites, Philadelphia (Lippincott) 1964. Zit. nach GABRIELI und PYZIKIEWICZ
- SCHLEYER, F.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspurenuntersuchung, Lübeck (Schmidt-Römhild) 1966
- SCHLEYER, F. und K. SELLIER: Untersuchungen über den Serumhämoglobingehalt in verschiedenen Venengebieten der Leiche. Z. ges. inn. Med. 20, 805, 1958
- SCHMIDT, TH.: Ein Beitrag zur Blutmengenbestimmung an Blutspuren. Z. gerichtl. Med. 26, 519, 1936

- SCHULZ, A.: Über quantitativen Blutnachweis.
Vjschr. gerichtl. Med. 29, 1, 1905
- SCHWARZ, F.: Eine Verschärfung der Benzidinreaktion.
Z. gerichtl. Med. 12, 216, 1928
- STRASSMANN, G. und E.
- ZIEMKE: Quantitative Blutuntersuchung. Vjschr.
gerichtl. Med. 21, 211, 1901
- WEBER, K.: Die Anwendung der Chemilumineszenz des
Luminols in der gerichtlichen Medizin
und Toxikologie. I. Der Nachweis von
Blutspuren. Dtsch. Z. gerichtl. Med.
57, 410, 1966
- WEEDE, I.: Untersuchungen zur Mengenbestimmung
von Blutflecken in Textilien mit der
Präzipitinmethode und mittels Rest-N-
Bestimmung. Diss. Marburg (im Druck)
- WU, H.: J. Biochem. Japan 2, 189, 1923. Zit.
nach BING und BAKER

Herrn Professor Dr. med. F. Schleyer danke ich für die Arbeitsmöglichkeit am Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Marburg und für die Überlassung des Themas, seine Beratung bei den Versuchen und bei der Abfassung der Dissertation.

Lebenslauf

Am 4. April 1939 wurde ich, Rudolf von Hansen, als Sohn des Gutsbesitzers Alfred von Hansen und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Ferberg in Waldeck, Kreis Wieck/Estland, geboren. Nach der Umsiedlung in den "Warthegau" im Oktober 1939 und der Flucht nach Deutschland im Jahre 1945 ging ich in Bielefeld und Werl in die Volksschule, dann in Oldenburg und Bielefeld in die Oberschule. Vom Herbst 1954 an besuchte ich das Deutsche Gymnasium in Amberg/Obpf., wo ich am 13. Juli 1960 das Reifezeugnis erhielt. Im Wintersemester 1960/61 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Marburg und legte dort am 7. Oktober 1963 die ärztliche Vorprüfung ab. Im Sommersemester 1964 studierte ich in Kiel, danach wieder in Marburg. Hier bestand ich am 3. März 1967 die ärztliche Prüfung. Vom 15. März 1967 bis zum 30. Juni 1967 war ich als Medizinalassistent bei Herrn Prof. Dr. med. F. Schleyer am Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg tätig. Seit dem 1. August 1967 bis zum 31. Dezember 1967 arbeite ich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Schwaiger in der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg als Medizinalassistent.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten:

in Marburg:

Amon, Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Brück,
Buchholz, Bücher, Cleve, Deicher, Delbrück, Dimroth,
Dölle, Drawert, Exner, Falke, Ganz, Gedigk, Golenhofen,
Hamm, Hensel, Herrmann, Heuser, Hildebrandt, Hohorst,
Hornung, Jakob, Klingenberg, Knauf, Lang, Linneweh, Löhr,
Lübbbers, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes, du Mesnil de
Röchemont, Neubauer, Niessing, Petry, Petzold, Poetsche,
Rodenhäuser, Roger, Rohen, Sauer, Schiff, Schleyer,
Schmid, Schmidt, Schürmann, Schrappe, Schwaiger, Seidel,
Siegert, Straub, Streicher, Vogt, Walcher, Würterle

in Kiel:

Bernsmeier, Eufinger, Huber, Löhr, Overbeck, Wulf

